

**Sulamaton kuitu (iNDF) merkkiaineena lypsylehmän ruokinnan sulavuus-
määrityksessä**

Laura Vainio

Maisterintutkielma

Helsingin yliopisto

Maataloustieteiden osasto

Kotieläinten ravitsemustiede

Maaliskuu 2019

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution – Department Maataloustieteiden osasto
Tekijä/Författare – Author Laura Emilia Vainio		
Työn nimi / Arbetets titel – Title Sulamaton kuitu (iNDF) merkkiaineena lypsylehmän ruokinnan sulavuusmäärittämisessä		
Oppiaine / Läroämne – Subject Kotieläinten ravitsemustiede		
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterintutkielma	Aika/Datum – Month and year Maaliskuu 2019	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 37 s.
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Sulavuustutkimuksen avulla pyritään arvioimaan eläinten ravintoaineiden tarvetta, kehittämään rehujen koostumuksia ja minimoimaan eläintuotannon ympäristövaikutukset. Eläimen rehunsyönnin ja sonnan kokonaiskeruun avulla laskettua sulavuutta käytetään laajasti, mutta menetelmään liittyy virhelähteitä ja ongelmia. Merkkiaineen käyttö sulavuuden tutkimisessa poistaa kokonaiskeruun tarpeen, mutta se ei ole myöskään ongelmaton. Sisäiset merkkiaineet ovat aineita, joita on luontaisesti rehussa, kuten piioksidi, ligniini, happoon liukenematon tuhka (AIA) ja sulamaton neutraalidetergenttikuitu (iNDF). Ulkoiset merkkiaineet ovat rehuun lisättäviä reagoimattomia valmisteita, kuten liukenemattomia metallioksidea, muovia, kumia tai väriaineita. Tämän tutkimuksen tavoitteena on verrata lypsylehmillä iNDF:n ja AIA:n avulla laskettuja sulavuuksia käyttäen aineistona aiemmin AIA:lla tehtyjä sulavuustutkimuksia.</p> <p>Tutkimusaineistona oli viisi Viikin opetus- ja tutkimustilan navetassa vuosina 2013–2015 tehtyä ruokintatutkimusta. Lehmien poikimisesta oli 100–212 päivää. Koeasetelmat olivat pääasiassa kahden neliön latinalaisia neliöitä. Ruokintakeskiarvoja aineistossa oli 21. Rehu- ja sonnanäytteistä määritettiin iNDF nailonpussimenetelmällä uittamalla näytenäytteitä 12 vrk kahden fistelöidyn lehmän pötsissä. Ravintoaineiden sulavuudet laskettiin iNDF-merkkiaineella ja orgaanisen aineen sulavuuksille laskettiin suhdeluku iNDF-sulavuus/AIA-sulavuus. Lisäksi laskettiin sonnan määrä ja sonnassa erittyneen iNDF:n osuus syödystä iNDF:stä (recovery). Aineistosta laskettiin koeruokintojen minimi ja maksimi, keskiarvo sekä keskihajonta. AIA- ja iNDF-merkkiaineella saatujen sulavuusarvojen välistä yhteyttä testattiin yksinkertaisella regressioanalyysillä. Lisäksi analysoitiin sekamallin regressioanalyysillä mitkä rehuannosta kuvaavat laatuparametrit selittivät parhaiten AIA- ja iNDF-sulavuuksien eroa.</p> <p>Tutkimusaineiston rehujen iNDF-pitoisuudet vaihtelivat 58–146 g/kg ka ja iNDF:n osuus NDF:stä 136–318 g/kg NDF. Koeruokintojen AIA-pitoisuudet vaihtelivat 8,6–14,9 g/kg ka ja iNDF-pitoisuudet 50,8–132 g/kg ka. Aineiston ruokintakeskiarvojen AIA:lla määritetty orgaanisen aineen sulavuus vaihteli 0,646–0,760, kuiva-aineen syönti 18,2–25,8 kg ka/pv, energiakorjattu maitotuotos 24,9–38,4 kg/pv ja väkirehun osuus 42,1–53,0 % kuiva-aineesta.</p> <p>Ravintoaineiden iNDF:llä määritetyt sulavuudet olivat keskimäärin pienempiä kuin AIA-sulavuudet. Orgaanisen aineen iNDF- ja AIA-sulavuuksien keskimääräinen suhdeluku oli 0,959 ja keskimääräinen erotus 0,028. Keskimäärin sonnassa erittyneen iNDF:n osuus syödystä iNDF:stä oli 0,922. Regressioanalyysin mukaan eri merkkiaineilla määritetyissä sulavuuksissa oli suurin ero rehuannoksen sulavuuden ollessa matala, mutta ero pieneni sulavuuden parantuessa. Parhaiten iNDF- ja AIA-sulavuuksien suhdelukua selitti dieetin iNDF-pitoisuus. Mitä suurempi dieetin iNDF-pitoisuus oli, sitä pienempi oli orgaanisen aineen sulavuus iNDF:llä määritettynä verrattuna AIA:lla määritettyyn.</p> <p>Tutkimuksen perusteella iNDF:llä ja AIA:lla saatujen sulavuustulosten välinen suhde vaihtelee riippuen rehuannoksen ominaisuuksista. Tutkielman aineistossa iNDF:n käyttö sisäisenä merkkiaineena vastasi AIA:lla saatua sulavuustuloksia sitä paremmin mitä pienempi rehuannoksen iNDF-pitoisuus oli ja mitä parempi rehuannoksen sulavuus oli.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Sulavuus, merkkiaine, sulamaton kuitu, AIA, iNDF, lypsylehmä		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Maataloustieteiden osasto ja Viikin kampuskirjasto		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Työtä ohjasi yliopistonlehtori Seija Jaakkola		

Tiedekunta/Osasto / Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos/Institution – Department Department of Agricultural Sciences
Tekijä/Författare – Author Laura Emilia Vainio		
Työn nimi / Arbetets titel – Title Indigestible fiber (iNDF) as a marker in dairy cow digestion studies		
Oppiaine / Läroämne – Subject Animal Nutrition		
Työn laji/Arbetets art – Level Master's Thesis	Aika/Datum – Month and year March 2019	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 37 p.
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>The aim of the digestibility measurements is to assess animal nutrient requirements, develop feed composition and minimize the environmental impact of animal production. Measurement of digestibility as the difference between total animal feed intake and total faecal output is widely used, but there are errors and problems with the total collection method. The use of a marker to investigate digestibility eliminates the need for total collection, but there are also some problems. Internal markers are substances naturally present in feed, such as silicon oxide, lignin, acid-insoluble ash (AIA), and indigestible neutral detergent fiber (iNDF). External markers are non-reactive preparations to be added to the feed, such as insoluble metal oxides, plastic, rubber or dye. The aim of this study was to compare the digestibility values measured with iNDF and AIA by collecting data from previous dairy cow studies using AIA as a marker.</p> <p>The research data consisted of five milk production trials (21 treatment means). The cows were in average 100–212 days in milk. The trials were arranged mainly using Latin square design. iNDF concentration of feed and faecal samples was determined by incubating the samples for 12 days in the rumen of two fistulated cows. The digestibility of nutrients was calculated by using iNDF as a marker. In addition, the ratio of iNDF digestibility /AIA digestibility for organic matter (OM), faeces output and iNDF recovery were calculated. The relationship between the digestibility obtained with the AIA and iNDF markers was tested by simple regression analysis. Mixed model regression analysis was used to estimate linear and quadratic effect of diet quality parameters on the ratio of iNDF/AIA digestibility.</p> <p>In the whole data, iNDF concentration of feeds varied from 58 to 146 g / kg DM and the proportion of iNDF from NDF was 136-318 g/kg NDF. Dietary AIA concentration varied from 8,6 to 14,9 g/kg DM and iNDF concentration from 50,8 to 132 g/kg DM. Organic matter digestibility of diet measured by AIA varied from 0,646 to 0,760, dry matter intake from 18,2 to 25,8 kg/day, energy-corrected milk yield from 24,9 to 38,4 kg/day, and proportion of concentrate 42,1-53,0% in dry matter.</p> <p>The digestibility of nutrients determined by iNDF was on average lower than the AIA digestibility. The average value for the ratio of iNDF/AIA OM digestibility was 0,959, for OM digestibility difference 0,028, and for iNDF recovery 0,922. According to the regression analysis, the difference between the digestibility determined by the different markers was the highest when the digestibility of the diet was low, but the difference was reduced when the digestibility improved. The iNDF and AIA digestibility ratio was best explained by the iNDF concentration of the diet. The higher the iNDF concentration of the diet, the lower the digestibility of the OM as determined by the iNDF compared to that determined by the AIA.</p> <p>The results suggest that the difference between digestibility values obtained using iNDF or AIA is affected by diet iNDF concentration and digestibility.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Digestibility, marker, indigestible fiber, AIA, iNDF, dairy cow		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisor: University Lecturer Seija Jaakkola		

Sisällys

1. Johdanto	5
2. Rehun sulavuus ja sen merkitys	6
3. Märehtijöillä käytetyt merkkiaineet	7
3.1 Happoon liukenematon tuhka (AIA)	8
3.2 Sulamaton neutraalidetergenttikuitu (iNDF)	9
3.3 Sulamattoman kuidun määrittäminen	10
4. Tutkimuksen tavoite	11
5. Aineisto ja menetelmät	11
5.1 Aineiston kerääminen	11
5.2 Merkkiaineiden analysointi	15
5.3. Tulosten laskenta ja tilastolliset analyysit	16
6. Tulokset	17
7. Tulosten tarkastelu	25
7.1 Rehujen ja ruokintojen merkkiainepitoisuudet	25
7.2. iNDF- ja AIA-sulavuuksien vertailu	27
8. Johtopäätökset	30
Kiitokset:	31
Lähteet:	31

1. Johdanto

Ravintoaineiden todellinen käyttökelpoisuus eläimen tarpeisiin on selvitettävä muun muassa siksi, että voisimme arvioida eläinten ravintoaineiden tarpeen, kehittää edullisempia rehujen koostumuksia ja minimoida eläintuotannon ympäristövaikutukset (Vandenberg and Noüe 2001). Eläimen rehunsyönnin ja sonnan kokonaiskeruun avulla laskettua sulavuutta käytetään laajasti, mutta menetelmään liittyy myös virhelähteitä ja ongelmia. Eläimiä pidetään tutkimusten ajan epäluonnollisissa oloissa esimerkiksi metaboliahäikeissä tai sonnankeräyspussi takapuoleen kiinnitettynä, mikä saattaa vaikuttaa eläimen metaboliaan ja lisäksi voi olla vaaraksi eläimen hyvinvoinnille. Ulosteen kokonaiskeruu ei ole myöskään yksinkertainen tehtävä (McNab 2000). Lypsylehmillä kokonaiskeruu toteutetaan usein laittamalla kumimatto parren ritilän päälle, johon uloste tippuu ja josta se kerään mahdollisimman usein. Lisäksi virtsa kerätään letkua pitkin säiliöön, jolloin kontaminaatiota ulosteen kanssa ei tule.

Merkkiaineen käyttö sulavuuden tutkimisessa poistaa kokonaiskeruun tarpeen ja sen epätarkkuudet, mutta toisaalta merkkiaineen käytössä on omat ongelmansa. Monia vuosia tutkijat ovat etsineet sopivia aineita merkkiaineiksi. Merkkiaineen täytyy olla täysin sulamaton ja imeytymätön, siinä ei saa olla farmakologista vaikutusta ruuansulatuskanavassa, sen täytyy mennä ruuansulatuskanavan läpi yhdenmukaisella nopeudella, olla helposti määriteltävissä kemiallisesti ja mielellään olla luonnollinen ainesosa rehussa (McDonald ym. 2011).

Jo vuonna 1918 ehdotettiin kromioksidia (Cr_2O_3) sopivaksi sulamattomaksi merkkiaineeksi, mutta sillä saatiin tehtyä tarpeeksi testejä vasta 25 vuotta myöhemmin. Kromioksidi on ollut käytetyin merkkiaine jo noin 50 vuotta ennustettaessa sulavuutta laiduntavilla märehäijöillä (Lippke 2002, Glindemann ym. 2009). Kuitenkin kromioksidin karsinogeeniset ominaisuudet ovat olleet huolenaiheena (Myers ym. 2004). Kromioksidin löytämisen jälkeen myös rehun luonnollinen ainesosa ligniini otettiin käyttöön merkkiaineena (McDonald ym. 2011). Tutkittuja merkkiaineita ovat olleet myös titaanioksidi sekä rehun sisäiset merkkiaineet, kuten selluloosa (Penning ja Johnson 1983), neutraalidetergenttikuitu (NDF), sulamaton happodetergenttikuitu (iADF), sulamaton

ligniini, happoon liukenematon tuhka (AIA) ja sulamaton neutraalidetergenttikuitu iNDF (Lippke ym. 1986, Van Soest 1994). Luonnolliset rehuissa valmiina olevat komponentit, joita voidaan käyttää merkkiaineina, ovat hyödyllisiä sillä merkkiaineiden valmistelua ei tarvita. Mittaamalla ulkoisen merkkiaineen suhdeluku rehussa ja sonnassa, ravintoaineiden sulavuus voidaan mitata ilman syönnin mittaamista ja sonnan kokonaiskeruuta. Sisäisen merkkiaineen käytössä useita rehuja syötettäessä täytyy mitata syöntisuhteet eri rehujen välillä, jotta saadaan koko rehuannoksen merkkiaineen pitoisuus selville.

2. Rehun sulavuus ja sen merkitys

Koko rehuannoksen sulavuus on tärkeää eläimen energian saannille. Oleellista sulavuudelle on nimenomaan kasvin solunseinämän sulavuus sekä karkearehuissa että väkirehuissa. Kasvin solunsisällysaineet sulavat ruuansulatuselimistössä käytännössä kokonaan. Karkearehut ovat lypsylehmien tärkein ravintokuidun lähde ja merkittävä energian lähde. Karkearehun kuitu tarjoaa huomattavan osan lypsylehmän energiasta. Kuitenkin kuidun sulatus tapahtuu ainoastaan mikrobifermentaation avulla pääasiassa pötsissä.

Karkearehun sulavuutta rajoittaa soluseinämärakenteen sulavuus (NDF) ja sulavan neutraalidetergenttikuidun (DNDF) sulavuusaste (Van Soest 1994). Rehun sulavuuteen vaikuttaa rehun omat ominaisuudet, kuten kuidun pitoisuus, sulamattoman kuidun pitoisuus ja potentiaalisesti sulavan kuidun osuus. Rehun sulavuuteen vaikuttaa myös eläimen ruokintataso ja rehun ravintoarvo. Rehuksvin kehitysvaihe, säilöntämenetelmä ja lisärehut vaikuttavat eläimen syöntiin ja sitä kautta sulavuuteen. Jokaisella rehulla on siis useita eri sulavuuksia eri ruokintatilanteista riippuen. NDF:n sulavuuteen on todettu vaikuttavan myös ruokailukäyttäytyminen, pureskeluaktiivisuus ja pötsin liikkeet (Soufizadeh ym. 2018).

Karkearehun ravintoarvo määräytyy pääasiassa rehukasvin kehitysvaiheen perusteella. Kuitenkin syötettäessä suuria määriä väkirehua, rehun ravintoarvo voi vähentyä. Syynä on negatiivinen yhdysvaikutus, joka ilmaantuu karkearehun ja väkirehun yhdistelmästä. Negatiivinen vaikutus ilmaantuu yleisimmin, kun korkeatuottoisten eläimien energiavajetta paikataan lisäämällä väkirehun määrää. Väkirehun lisäys vähentää rehun soluseinien sulatusta ja siihen vaikuttaa mm. lisäyksen suuruus, väkirehun hiilihydraattikoostumus, ruokintataso, rehun laatu ja puskureiden käyttö. Sulavuuden väheneminen on seurausta pötsin pH:n alenemisesta (Huhtanen 1991).

Väkirehujen osuuden kasvattaminen lisää kokonaissyöntiä, mutta vähentää karkearehujen syöntiä (Stensig ja Robinson 1997). Vähentynyt karkearehujen syönti voidaan liittää huonompaan sulavuuteen ja ruokasulan kulkuun (Colucci ym. 1990), jotka molemmat hallitsevat pötsin täyteisyyttä. Pötsin täyteisyys voi myös rajoittua korkeilla väkirehupitoisuuksilla, koska väkirehuja sisältävä ruokasula poistuu hitaammin pötsistä.

3. Märehtijöillä käytetyt merkkiaineet

Ruokasula voidaan jakaa kahteen osaan, nesteeseen ja partikkeliosaan. Hyvän merkkiaineen oletetaan olevan tasaisesti sekoittuneena sen ruokasulan osan kanssa, jota halutaan mitata. Merchenin (1998) mukaan merkkiaineet voidaan jakaa karkeasti kahteen kategoriaan, sisäisiin ja ulkoisiin merkkiaineisiin. Sisäiset merkkiaineet ovat aineita, joita on luontaisesti rehussa, kuten piioksidi, AIA ja ligniini. Jokaisella näistä on omat ongelmansa sulavuuden mittaamisessa. Ligniini on teoreettisesti sulamaton osa soluseinää, mutta sen määrän on todettu silti vähenevän sulamisprosesseissa. Happon liukenemattomalla tuhalla ja piioksidilla on taas päinvastainen ongelma ligniiniin verrattuna, sillä niiden antamat tulokset voivat vääristyä rehun kontaminaatiosta maa-perän tai kuivikemateriaalin kanssa.

Ulkoiset merkkiaineet ovat rehuun lisättäviä reagoimattomia valmisteita, kuten liukenemattomia metallioksiedeja, muovioja, kumioja tai väriaineita (Van Soest 1994). Ne voidaan antaa eläimelle suun kautta, infusoida pötsiin fistelin kautta tai laitteen kautta, joka annostelee merkkiainetta hallitusti jatkuvasti (Lippke 2002).

Polyetyleeniglykolia (PEG) on usein käytetty nestefaasin merkkiaineena, mutta sen ongelmat ovat imeytymisessä ja analysoinnissa. Muovioja merkkiaineita on myös käytetty useissa tutkimuksissa onnistuneesti. Muovisten merkkiaineiden hyödyt ovat niiden koon joustavuudessa ja painon spesifioinnissa, jolloin merkkiainetta voidaan käyttää erikokoisten rehupartikkelien kanssa. Märehtijöillä tarpeeksi pieni partikkelikoko merkkiaineessa mahdollistaa normaalin märehtimiskäyttäytymisen tutkimisen (Welch 1990).

3.1 Happoon liukenematon tuhka (AIA)

Happoon liukenematon tuhka koostuu sulamattomista mineraaliyhdisteistä, pääasiassa piidioksidista eli silikasta. Silikaa on käytetty sulavuuden mittaamisessa jo vuodesta 1874 (Kotb ja Luckey 1972). AIA-pitoisuus rehussa ja ulosteessa mitataan gravimetrisellä menetelmällä. Rehu ja ulosteet kuivataan, tuhkataan, tuhka keitetään suolahapossa, suodatetaan, pestään ja tuhkataan uudelleen. Tutkimukset ovat osoittaneet, että AIA:ta on oltava tarpeeksi rehussa, jotta laskennassa ei tule tulokseksi epärealistisia sulavuuksia (Van Keulen ja Young 1977, Jones ja De Silva 1998). Thonney ym. (1985) ovat osoittaneet, että AIA:n määrä rehussa pitäisi olla yli 7,5 g/kg ka, jotta mittaukset olisivat luotettavia. Dieetin pitäisi sisältää tiettyjä kasvisolukkoja, joissa on paljon AIA:ta. Runsaasti AIA:ta sisältäviä kasveja ovat mm. kuivien olosuhteiden sinimailanen ja nuokkukattara. Erityistä tarkkuutta vaaditaan tutkittaessa AIA:n avulla laiduntavien eläinten rehujen sulavuuksia, sillä laitumesta eläimet saattavat syödä myös maaperää, joka sisältää AIA:ta. Sulavuuden tutkiminen AIA:n avulla on helppoa ja halpaa verrattuna kokonaiskeruuseen, mutta vaatii erityistä tarkkuutta ja taitoa analyyseissä (Sales

ja Janssens 2003). AIA on helpompi mitata kuin muut rehun merkkiaineet ja sitä on käytetty onnistuneesti rehun sulavuuden mittaamisessa (Van Keulen ja Young 1977).

3.2 Sulamaton neutraalidetergenttikuitu (iNDF)

Neutraalidetergenttikuitu (NDF) kuvaa rehun kokonaiskuitupitoisuutta ja se sisältää pääasiassa selluloosaa, hemiselluloosaa ja ligniiniä. Sulamaton osa NDF:stä eli iNDF on NDF:n osa, jota pötsimikrobit eivät kykene hajottamaan ja se ei sula lainkaan fermentaatioissa. Ligniini, joka ei ole hiilihydraatti vaan polymeeri, antaa soluseinämälle kemiallisen ja biologisen vastustuskyvyn, sekä mekaanisen vahvuuden kasville. Ligniini estää myös muiden ainesosien, kuten hiilihydraattien, sulavuutta, jos ne ovat sitoutuneena ligniiniin soluseinämässä (McDonald ym. 2011).

NDF-analyysi sisältää suurimman osan kasvin soluseinämän rakenteellisista komponenteista ja se on suositeltu menetelmä, kun halutaan erottaa rakenteelliset ja ei-rakenteelliset hiilihydraatit kasvisoluista, ja mitata kuitufraktioiden osuus (Van Soest 1994). Neutraalidetergenttiin liukenevat komponentit, kuten b-glukaani ja pektiinit, ovat osa rakenteellisia hiilihydraatteja soluseinässä. Ne sulavat nopeasti pötsissä verrattuna komponentteihin, jotka sisältyvät NDF-fraktioon (hemiselluloosa, selluloosa ja ligniini). NDF tarjoaa energiaa märehtijöille mikrobisynteetissä ja edesauttaa pötsin toimintaa ja eläimen terveyttä lisäämällä rakennetta dieettiin. Kuidun käyttökyky vaihtelee rehujen välillä ja sulavuuteen vaikuttaa muun muassa ruokintataso sekä säilörehun ja väkirehun suhde ruokinnassa (Huhtanen ja Jaakkola 1993, Stensig ja Robinson 1997).

Sulavuus määritellään perinteisesti syödyn ravintoaineen ja sonnan sisältämän ravintoaineen erotuksena, joko suoraan määritettynä tai merkkiaineen avulla. Ligniiniä on usein käytetty merkkiaineena, mutta ligniini ei ole muuttumaton ruuansulatuskannassa (Fahey ja Jung 1983). Ellis ym. (1999) luonnehti sulamatonta NDF:ää (iNDF) ideaaliseksi ravintokokonaisuudeksi sen sulamattomuuden vuoksi. Sulamatonta NDF:ää

voi käyttää merkkiaineena, jos mittaukset tehdään standardoidusti in vitro tai in situ, ja jos sulamista ei tapahdu.

3.3 Sulamattoman kuidun määrittäminen

Laajaa kirjallisuutta erilaisia in vitro- ja in situ – menetelmiä käytetään määrittämään pötsin kuidun hyväksikäyttöä. Sulava NDF määritetään solunseinämäkuidun kokonaismäärän ja sulamattoman NDF:n (iNDF) erotuksena. Sulamaton kuitu (iNDF) on kuitufraktio, joka on täysin sulamaton eläimen elimistössä. Sen sulamattomuus johtuu ristikuidusta ligniinin ja hemiselluloosan välillä (Van Soest 1994). Perinteisesti ravitsemustieteilijät ovat keskittyneet pääasiassa kuidun sulavuuteen NDF:n ja happodetergenttikuidun (ADF) kautta. Mittauksiin kannattaisi sisällyttää myös sulamattomat kuidut, koska ne vaikuttavat pötsin liikkeisiin ja määrittävät lopullisen kuidun sulavuuden pötsissä (Cotanch ym. 2014).

Rehun iNDF-pitoisuuden määrittämisen tärkeys on kasvanut moderneissa rehuarviointimenetelmissä, koska sitä kautta voidaan määrittää rehun nettoenergia-arvo (Krämer ym. 2012). Rehun iNDF-pitoisuus on usein arvioitu laskemalla ligniinipitoisuudesta seuraavalla kaavalla: $iNDF = \text{lignini} \times 2,4$ (Chandler ym. 1980). Rehun iNDF-pitoisuus voidaan määrittää useammalla tavalla, joista luotettavin on rehun pitkä (yli 10 pv) pötsiutto pienisilmäisiä ($< 20 \mu\text{m}$) nailonpusseja käyttäen (Penning ja Johnson 1983, Huh-tanen ym. 1994).

Nailonpussiuitoissa täytyy ottaa huomioon uittoaika sekä pussien silmäkoko. Liian lyhyessä inkubaatiossa potentiaalisesti sulava NDF ei ehdi sulaa ja liian iso silmäkoko mahdollistaa partikkelien liikkumisen pussin läpi. Alle 20mm silmäluku minimoi partikkelihäviön ja yli 10 päivän uitto mahdollistaa täydellisen potentiaalisen sulavuuden (Nousiainen ym. 2004).

Maatilanäytteiden analysointiin tarvitaan kuitenkin helpompi menetelmä iNDF:n määrittämiseen. Lähi-infrapunaspektroskopian (near infrared reflectance spectroscopy, NIRS) on todettu olevan potentiaalinen menetelmä iNDF:n määrittämisessä. NIRS määrittää iNDF-pitoisuutta hyvällä tarkkuudella esimerkiksi säilörehusta (Park ym. 1997, Nousiainen ym. 2004). NIRS-tekniikan käyttäminen vaatii kuitenkin kalibrointia. NIRS-tekniikan kehitys perustuu laajaan kalibraatiokirjastoon, jossa on määritetty karakterisoidut arvot eri rehuille (Park ym. 1997).

4. Tutkimuksen tavoite

Tämän tutkimuksen tavoitteena on verrata lypsylehmillä iNDF:n ja AIA:n avulla laskettuja sulavuuksia käyttäen aineistona aiemmin tehtyjä sulavuustutkimuksia. Tutkimuksessa selvitetään, voisiko iNDF:n avulla tutkia ruokintojen sulavuutta luotettavasti.

5. Aineisto ja menetelmät

5.1 Aineiston kerääminen

Tutkimuksessa käytettiin viiden lypsylehmätutkimuksen tulosaineistoa. Kaikki viisi koea tehtiin Viikin opetus- ja tutkimustilan navetassa aikavälillä kevät 2013-kevät 2015 ja koe-eläiminä oli ayrshire-lehmiä. Lehmien poikimisesta oli keskimäärin eri kokeissa 100–212 päivää. Koeasetelmat olivat pääasiassa kahden neliön latinalaisia neliöitä. Kokeissa mitattiin eläinten elopainot, kuntoluokitukset, rehunkulutukset ja maitomäärät sekä otettiin rehu-, maito-, pötsi-, sonta-, virtsa- ja verinäytteitä. Koeasetelmat on esitetty tarkemmin taulukossa 1.

Taulukko 1. Aineiston tutkimusten koeasetelmat.

Koe	Vuosi	Eläinmäärä	Päivää poikimisesta	Koemalli	Ruokinnat
Koe 309	2013	12 lehmää, joista 6 ensik- koa	115	cycling change over, 6 ruokintaa, kaksi 6 eläimen blokkia, kolme 21 vrk:n jaksoa	1= Rypsi, matala valkuaistaso (RM), 2= Rypsi+härkäpapu, matala valkuaistaso (RHM), 3= Härkäpapu, matala valkuais- taso (HM), 4= Rypsi, korkea valkuaistaso (RK), 5= Rypsi+här- käpapu, korkea valkuaistaso (RHK), 6= Härkäpapu, korkea valkuaistaso (HK)
Koe 311	2013	6 lehmää	212	kaksinkertainen 3x3 latinalainen neliö	Levä 0=kontrolli, levä 1= 50 % RY korvaus levällä (0,5kg/pv), levä 2= RY korvaus kokonaan levällä (1,0kg/pv)
Koe 315	2014	8 lehmää	100	kaksinkertainen 4x4 latinalainen neliö	Timotei-nurminatasäilörehu (Nurmi) TAI seos, jossa puolet nurmisäilörehun ka:sta korvattu härkäpapu-kevätevehnäsäi- lörehulla (Härkäpapu). Väkirehun rv-pitoisuus joko 17,5 tai 20 g/kg ka.
Koe 316	2014	8 lehmää	186	kaksinkertainen 4x4 latinalainen neliö	Väkirehu: 1= Kontrolli (vilja-leikeseos), 2=Rypsi (vilja-leike- seos+rypsitiiviste), 3= Rypsin ja Spirulina-levän sekoitus (vilja-leikeseos+rypsitiivisteestä puolet spiruliina-levä), 4=Spirulina-levä (vilja-leikeseos+Spirulina-levä)
Koe 322	2015	8 lehmää	113	kaksinkertainen 4x4 latinalainen neliö	1=Rypsi, 2=Rypsi (50 %)+Spirulina-levä (50 %), 3=Härkäpapu, 4= Härkäpapu(50 %)+Spirulina-levä (50 %)

Koe 309

Kokeessa tutkittiin härkäpavun kahden annostustason vaikutusta lehmien tuotokseen rypsirouheeseen verrattuna, kun karkearehuna on heinäkasvisäilörehu (Puhakka ym. 2016). Valkuaisrehut olivat rypsirouhe, härkäpapu tai niiden sekoitus (1:1) joko korkeammalla tai matalammalla valkuaistasolla. Koekäsittelyt olivat:

- 1 = Rypsi, matala valkuaistaso (RM)
- 2 = Rypsin ja härkäpavun seos, matala valkuaistaso (RHM)
- 3 = Härkäpapu, matala valkuaistaso (HM)
- 4 = Rypsi, korkea valkuaistaso (RK)
- 5 = Rypsin ja härkäpavun seos, korkea valkuaistaso (RHK)
- 6 = Härkäpapu, korkea valkuaistaso (HK)

Lehmät saivat väkirehua 12 kg/pv ja hiehot 10 kg/pv. Matalan valkuaistason dieetissä lehmät saivat väkirehusta rypsirouhetta 1,55 kg/pv ja korkean valkuaistason dieetissä 3,65 kg/pv. Ensikot saivat rypsirouhetta matalan valkuaistason dieetissä 1,29 kg/pv ja korkean valkuaistason dieetissä 3,04 kg/pv. Härkäpapua lehmät saivat 1,80 ja 4,20 kg/pv ja ensikot 1,50 kg/pv ja 3,50 kg/pv.

Koe 311

Tutkimuksessa selvitettiin leväjauhon (Spirulinan ja Chlorellan seos) vaikutusta lypsy-lehmien rehun syöntiin ja maidontuotantoon, kun korvattiin rypsirouhe osittain tai kokonaan levällä (Lamminen ym. 2017).

Kontrolliruokinnalla (levä0) lehmät saivat rakeistettua rehua, josta osa oli vilja-leike-seosta (8,7 kg/pv) ja osa rypsiitiivistettä (2,3 kg/pv). Muilla ruokinnoilla rypsiitiivisteestä korvattiin puolet (Levä1, 0,5 kg/pv) tai se korvattiin kokonaan levällä (Levä2, 1,0 kg/pv) siten, että levän valkuaismäärä korvasi rypsiitiivisteiden valkuaisten. Vilja-leikeseoksen

määrää muutettiin siten, että väkirehun kokonaismäärä päivässä (11 kg) oli kaikilla ruokinnoilla sama.

Koe 315

Kokeessa tutkittiin härkäpapu-kevätevehnäsäilörehun vaikutusta lypsylehmien rehun syöntiin ja maidontuotantoon, kun sillä korvattiin osa nurmisäilörehusta (Lamminen ym. 2016). Kokeessa tutkittiin myös väkirehun valkuaispitoisuutta.

Säilörehuja olivat timotei-nurminatasäilörehu (Nurmi) ja seos, jossa puolet nurmisäilörehun kuiva-aineesta korvattiin härkäpapu-kevätevehnäsäilörehulla (Härkäpapu). Väkirehun raakavalkuaispitoisuus oli 175 g/kg ka (Valk 1) tai 200 g/kg ka (Valk 2) kuiva-aineesta.

Koe 316

Kokeessa tutkittiin Spirulina-leväjauhon vaikutusta valkuaisrehuna lypsylehmien rehun syöntiin, maidontuotantoon ja typen hyväksikäyttöön, kun korvattiin rypsirouhe osittain tai kokonaan levällä (Lamminen ym. 2019a). Koeruokinnat olivat:

1 = Valkuaislisätön kontrolli

2 = Rypsi

3 = Rypsin ja Spirulina-levän seos

4 = Spirulina-levä

Kontrolliruokinnalla lehmät saivat väkirehuna valkuaislisätöntä vilja-leikeseosta (11,7 kg/pv). Rypsiroukinnalla lehmät saivat vilja-leikeseosta ja rypsiäivistettä. Leväruokinnoilla rypsin valkuaisesta korvattiin puolet tai se korvattiin kokonaan Spirulina-levän valkuaisella siten, että raakavalkuaisen saanti pysyi samana. Melassileike ja seosmelassi kompensoitiin, jotta päivittäinen seosmelassin ja melassileikkeen saanti väkirehusta on lähes sama kaikilla koeruokinnoilla. Vilja-leikeseoksen määrää muutettiin siten, että väkirehun kokonaismäärä päivässä (12 kg) oli kaikilla ruokinnoilla sama.

Koe 322

Kokeessa tutkittiin härkäpapua ja rypsiä lypsylehmien valkuaisrehuina sekä valkuaisenlähteen vaikutusta rehun syöntiin, pötsikäymiseen, maidontuotantoon sekä typen hyväksikäyttöön nurmisäilörehupohjaisella ruokinnalla (Lamminen ym. 2019b). Kokeessa myös puolet härkäpavun ja rypsin sisältämästä raakavalkuaisesta korvattiin Spirulina-levän raakavalkuaisella. Koeruokinnat olivat:

1 = Rypsi

2 = Rypsi + Spirulina-levä

3 = Härkäpapu

4 = Härkäpapu + Spirulina-levä

Tutkittavina tekijöinä olivat väkirehun valkuais täydennyksen lähde (rypsi vs. härkäpapu) sekä rypsin ja härkäpavun korvaaminen Spirulina-levällä. Seosrehun karkearehuväkirehu -suhde oli 55:45. Leväruokinnoissa rypsin tai härkäpavun valkuaisesta korvattiin puolet Spirulina-levän valkuaisella siten, että raakavalkuaisen saanti oli vakio.

5.2 Merkkiaineiden analysointi

Tutkimuksissa kerätyt rehu- ja sontanäytteet kuivatettiin tuulettavassa kuivauskaapissa (Memmert, Memmert GmbH, Schwabach, Saksa), ensin 103 °C:ssa tunnin ajan, jonka jälkeen rehunäytteet 50 °C:ssa ja sontanäytteet 70 °C:ssa kahden vuorokauden ajan. Kuivatut analyysinäytteet jauhettiin iNDF-analyysiin 1 mm:n seulalla, sontanäytteet 1,5 mm:n seulalla, vasaramyllyllä (sakomylly KT-3100, Koneteollisuus Oy, Helsinki, Suomi). Happon liukenematon tuhka mitattiin menetelmällä, joka on kuvattu tutkimuksessa Van Keulen ja Young (1977).

Näytteistä iNDF määritettiin nailonpussimenetelmällä (Ahvenjärvi ym. 2000, Huhtanen ym. 2006) uittamalla näytepusseja 12 vrk kahden fistelöidyn lehmän pötsissä ruokinnan väkirehuosuuden olleessa n. 40 % kuiva-aineesta. Näytettä punnittiin 4 grammaa/pussi ja niitä tehtiin kaksi kappaletta/lehmä. Uiton jälkeen pussit pestiin pesukoneessa, keitettiin 60 minuutin ajan kiehuvalle NDF-liuokselle, pestiin uudelleen ja kuivattiin. Pussien silmäkoko oli 17 µm. iNDF jäännöstä ei tuhattu.

5.3. Tulosten laskenta ja tilastolliset analyysit

Kaikkien kokeiden iNDF-sulavuudet laskettiin samalla tavalla kuin AIA:lla käyttäen seuraavia kaavoja:

Dieetin kuiva-aineen sulavuus = $1 - (\text{merkkiaineen pitoisuus dieetin kuiva-aineessa} / \text{merkkiaineen pitoisuus sonnan kuiva-aineessa})$

Ravintoaineiden sulavuus = $1 - ((\text{dieetin merkkiainepitoisuus} / \text{sonnan merkkiainepitoisuus}) \times (\text{sonnan ravintoainepitoisuus} / \text{dieetin ravintoainepitoisuus}))$

Aineistosta laskettiin koeruokintoja kuvaavien parametrien minimi ja maksimi, keskiarvo sekä keskihajonta. Lisäksi laskettiin orgaanisen aineen (OA) sulavuuksien suhdeluku (iNDF-sulavuus/AIA-sulavuus), kun merkkiaineena käytettiin AIA:ta tai iNDF:ää. Samoin laskettiin sonnan määrä ja sen avulla sonnassa erittyneen iNDF:n osuus syödystä iNDF:stä (recovery) AIA:lla määritetyn sulavuuden perusteella. Sonnan määrä laskettiin seuraavasti:

Sonnan määrä (kg ka/pv) = rehun syönti (kg ka/pv) \times (1 - kuiva-aineen sulavuus (kg/kg))

Aineiston analysoinnissa käytettiin havaintoina ruokintakeskiarvoja, joita oli yhteensä 21. Tilastollisissa analyysissä käytettiin SAS:in versiota 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Aluksi testattiin yksinkertaisella regressioanalyysillä SAS:in REG-proseduurilla

kahdella eri merkkiaineella saatujen sulavuuksien välistä yhteyttä. Sen jälkeen analysoitiin sekamallin regressioanalyysillä koeruokintojen laatua kuvaavien parametrien (iNDF-pitoisuus, iNDF:n osuus NDF:stä, väkirehuosuus, raakavalkuaispitoisuus sekä orgaanisen aineen ja NDF:n sulavuus määritettynä AIA:lla) yhteyttä OA-sulavuuksien keskinäiseen suhteeseen (iNDF-sulavuus/AIA-sulavuus -suhdeluku) SAS:n PROC MIXED-proseduurilla käyttäen REML- ja COVTEST-optioita. Laatuparametrien ja iNDF/AIA-suhteen välinen riippuvuus testattiin lineaarisen ja toisen asteen regressioanalyysillä niin, että mallissa oli mukana koe satunnaistekijänä St-Pierren (2001) kuvaamalla tavalla. Aluksi mallissa leikkauspiste ja kulmakerroin olivat sekä kiinteinä tekijöinä että satunnaistekijöinä. Kun mallille ei löytynyt ratkaisua, muutettiin random-lausekkeessa UN-kovarianssirakenteen tilalle VC. Kulmakertoimen vaihtelu kokeiden välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää, joten lopullisissa malleissa kulmakerroin poistettiin random-lausekkeesta. Lineaarisen ja toisen asteen malleja verrattiin jäännösvaihtelun (RMSE, Root Mean Squared Error) ja korjatun selityksasteen perustella. Esitettävät regressiokäyrät kuvaavat selitettävän muuttujan (iNDF/AIA-suhdeluku) ennustetun arvon ja selittävän muuttujan (laatuparametri) välisen riippuvuussuhteen. Kuvaajat on esitetty käyttäen korjattuja (adjusted) selitettävän muuttujan arvoja. Suhdeluvun jakauman normaalisuus sekä varianssin homogeenisuus tarkastettiin mallin tuottamien residuaalien jakaumasta.

6. Tulokset

Kokeiden rehujen syöntimäärät, maitotuotokset ja sonnan määrät ovat taulukossa 2. Aineiston ruokintakeskiarvojen kuiva-ainesyönnit vaihteli 18,2–25,8 kg ka/pv ja vastaa-vasti energiakorjattu maitotuotos 24,9–38,4 kg/pv. Väkirehun osuus kuiva-aineessa vaihteli 42,1–53,0 %:n välillä eri kokeissa.

Taulukko 2. Kokeiden syönnin, väkirehumäärän ja –osuuden sekä energiakorjatun maidon parametreja.

	N	Keskiarvo	Min	Max	Keskihajonta
Syönti yhteensä, kg ka/pv	21	22,4	18,2	25,8	1,99
Väkirehu, kg ka/pv	21	10,2	9,60	11,3	0,643
Väkirehun osuus, % ka:sta	21	45,5	42,1	53,0	2,53
EKM, kg/pv	21	31,5	24,9	38,4	3,86

EKM = Energiakorjattu maito, ka=kuiva-aine

Kokeissa käytettyjen rehujen iNDF-pitoisuudet ja muita rehutietoja on esitetty taulukossa 3. Nurmisäilörehut olivat pääasiassa ykkössadon rehuja, paitsi kokeissa 316 ja 322 kakkossatoa. Nurmisäilörehujen NDF-pitoisuus vaihteli 480–589 g/kg ka kakkossatojen pitoisuuksien ollessa alhaisimmat, iNDF-pitoisuus vaihteli 58,2–146 g/kg ka.

Koeruokintojen AIA-merkkiainepitoisuudet vaihtelivat 8,6–14,9 g/kg ka (taulukko 4). Vastaavasti iNDF-pitoisuudet vaihtelivat 50,8–132 g/kg ka. Rehuissa iNDF:n osuus NDF:stä vaihteli 136–318 g/kg NDF.

Taulukko 3. Kokeiden rehujen NDF- ja iNDF-pitoisuudet ja muita rehutietoja.

	Säilörehun niittokerta	D-arvo g/kg ka	NDF g/kg ka	iNDF g/kg ka	g/kg NDF
Koe 309					
Nurmisäilörehu	1.sato 8.6.2012	719	529	74,0	140
Rypsi-täysrehu			219	80,0	365
Rypsi-härkäpapu-täysrehu			205	65,6	320
Härkäpapu-täysrehu			191	51,1	267
Koe 311					
Nurmisäilörehu	1.sato 13.6.2013	664	589	146	248
Vilja-leikeseos			334	33,7	101
Rypsitiiviste			294	40,1	136
Koe 315					
Nurmisäilörehu	1.sato 10.6.2013	678	517	108	209
Härkäpapusäilörehu	5.8.2013	611	433	201	464
RV157 täysrehu			211	70,6	335
RV200 täysrehu			219	77	352
Koe 316					
Nurmisäilörehu	2.sato 2.8.2014	662	480	100	208
Vilja-leikeseos			363	118	325
Rypsitiiviste			272	123	452
Melassileike			338	27,4	81,0
Koe 322					
Nurmisäilörehu	2.sato 22.7.2014	681	505	58,2	115
Ohra			201	40,8	203
Melassileike			358	129	360
Rypsirouhe			318	167	525
Härkäpapu			158	3,2	20,0
Spirulina-levä			0	0	0

NDF= neutraalidetergenttikuitu, iNDF= sulamaton neutraalidetergenttikuitu

D-arvo = sulava orgaaninen aine kuiva-aineessa, RV= raakavalkuainen

Taulukko 4. Aineiston ruokintakeskiarvojen merkkiaine- ja ravintoainepitoisuudet, g/kg ka, jos ei muuta mainittu.

	n	Keskiarvo	Min	Max	Keskihajonta
AIA	21	11,4	8,6	14,9	2,10
iNDF	21	88,9	50,8	132	26,13
Raakavalkuainen	21	162	125	180	13,7
NDF	21	394	346	469	34,4
Tärbkelys	14	168	122	193	21,3
iNDF g/kg NDF	21	223	136	318	550

AIA=sulamaton tuhka, NDF= neutraalidetergenttikuitu, iNDF= sulamaton neutraalidetergenttikuitu

Sulavuusmääritykset tehtiin sekä AIA-merkkiaineella että iNDF:llä ja niiden eroa vertailtiin. Sulavuudet molemmilla merkkiaineilla on esitetty taulukossa 5. Keskimäärin ravintoaineiden iNDF-sulavuudet olivat pienempiä kuin AIA-sulavuudet lukuun ottamatta tärkkelyksen sulavuutta, joka oli sama molemmilla menetelmillä. Orgaanisen aineen iNDF- ja AIA-sulavuuksien keskimääräinen suhdeluku oli 0,959 ja keskimääräinen erotus oli 0,028. Sulavuuksien minimiarvoissa oli huomattavasti suurempi ero AIA:n ja iNDF:n välillä kuin maksimiarvoissa. Keskimäärin sonnassa erittyneen iNDF:n osuus syödyistä iNDF:stä oli 0,922 (recovery).

Taulukko 5. Ruokintojen sulavuudet määritettynä AIA- ja iNDF-merkkiaineilla, orgaanisen aineen sulavuuksien suhde iNDF-sulavuus/AIA-sulavuus sekä sonnassa erittyneen iNDF:n osuus rehun iNDF:stä.

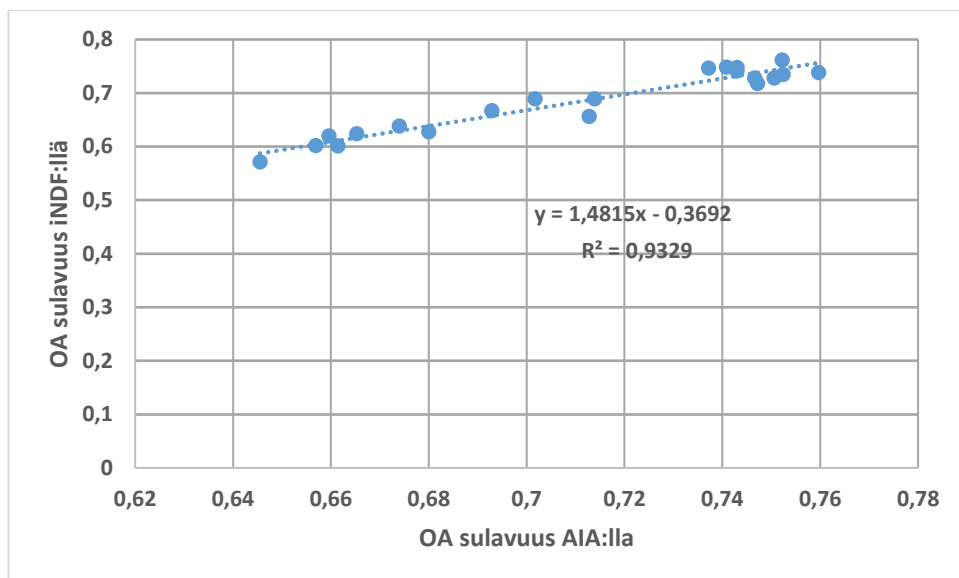
	n	Keskiarvo	Min	Max	Keskihajonta
AIA merkkiaineena					
Kuiva-aine	21	0,698	0,637	0,743	0,0360
Orgaaninen aine	21	0,712	0,646	0,760	0,0390
NDF	21	0,580	0,441	0,705	0,0830
Raakavalkuainen	21	0,660	0,572	0,718	0,0354
Tärkkelys	14	0,958	0,931	0,972	0,0109
iNDF merkkiaineena					
Kuiva-aine	21	0,669	0,562	0,747	0,0581
Orgaaninen aine	21	0,684	0,572	0,762	0,0604
NDF	21	0,539	0,324	0,685	0,1143
Raakavalkuainen	21	0,628	0,482	0,727	0,0605
Tärkkelys	14	0,956	0,933	0,969	0,0095
OA-sulavuus					
iNDF/AIA	21	0,959	0,885	1,015	0,0369
iNDF recovery	21	0,922	0,832	1,068	0,0576

AIA= sulamaton tuhka, NDF=neutraalidetergenttikuitu, iNDF= sulamaton detergenttikuitu, OA=orgaaninen aine, recovery=saanto

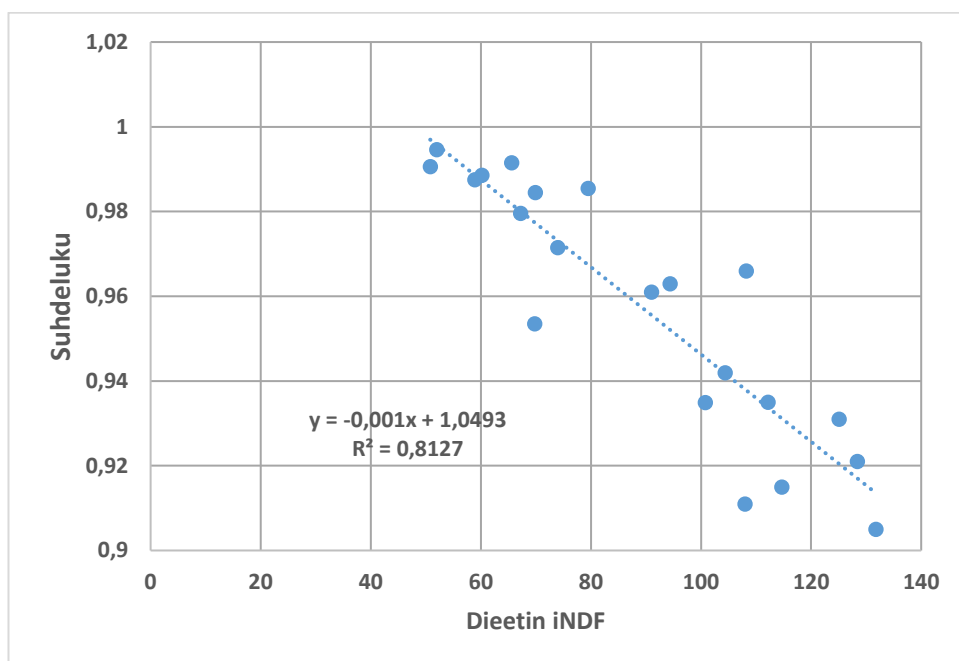
Taulukossa 6 on esitetty sulavuuksien välinen riippuvuus regressioyhtälöinä, kun sulavuuden merkkiaineena on käytetty joko AIA:ta (selittävä muuttuja) tai iNDF:ää (selitettävä muuttuja). Mallin selitysaste ($AdjR^2$) orgaanisen aineen sulavuudessa oli 0,929. Muiden ravintoaineiden kohdalla selitysasteet vaihtelivat 0,915 ja 0,957 välillä. Tärkkelyksen sulavuutta lukuun ottamatta leikkauspiste oli negatiivinen ja kulmakerroin vaihteli 1,34–1,65. Tämä osoitti, että eri merkkiaineilla määritettyjen sulavuuksien välillä oli

aineistossa eroa erityisesti sulavuuden ollessa matala, mutta ero pieneni sulavuuden parantuessa. Tärkkelyksen leikkauspiste oli 0,133 ja kulmakerroin 0,86. Kuvassa 1 on esitetty AIA:lla ja iNDF:llä määritettyjen orgaanisen aineen sulavuuksien yhteyttä kuvaava regressiosuora.

Eri merkkiaineilla saatujen sulavuuserojen vaihteluun etsittiin selitystä ruokinnan laatuparametreista. Ruokinnan väkirehuosuus ja raakavalkuaispitoisuus selittivät hyvin heikosti vaihtelua. Parhaiten iNDF- ja AIA-sulavuuksien suhdelukua kuvasi selityksasteen perusteella dieetin iNDF-pitoisuus lineaarisen mallin mukaan (AdjR^2 0,803) (taulukko 7). Mitä suurempi dieetin iNDF-pitoisuus oli, sitä pienempi oli orgaanisen aineen sulavuus iNDF:llä määritettynä verrattuna AIA:lla määritettyyn (Kuva 2). Lineaarisen ja toisen asteen mallien jäännösvaihtelussa ei ollut eroa. Kun selittävänä tekijänä oli iNDF:n osuus NDF:stä, lineaarinen malli (0,773) oli parempi kuin toisen asteen malli (0,737). Taulukossa 7 ei ole esitetty toisen asteen mallin tuloksia, jos toisen asteen termin regressiokerroin ei ollut tilastollisesti merkitsevästi nolasta poikkeava ja kun toisen asteen malli ei pienentänyt jäännösvirhettä tai parantanut merkittävästi selityksastetta.



Kuva 1. Eri merkkiaineilla (sulamaton neutraalidetergenttikuitu iNDF ja happoon liukene-
maton tuhka AIA) määritetyn orgaanisen aineen (OA) sulavuuksien yhteys.



Kuva 2. Dieetin iNDF-pitoisuus ja suhdeluku orgaanisen aineen iNDF-sulavuus/AIA-sulavuus.

Taulukko 6. Sulavuuksien välinen yhteys yksinkertaisessa regressioanalyysissä, kun merkkiaineena joko happoon liukenematon tuhka (AIA) (selittävä muuttuja) tai sulamaton kuitu (iNDF) (selitettävä muuttuja).

	n	Leikkaus- piste	SE	P-arvo	Kulma- kerroin	SE	P-arvo	RMSE	R ²	AdjR ²
Kuiva-aine	21	-0,402	0,073	< 0,001	1,54	0,104	<0,001	0,017	0,920	0,915
Orgaaninen aine	21	-0,369	0,065	< 0,001	1,48	0,091	<0,001	0,016	0,933	0,929
Raakavalkuainen	21	-0,463	0,070	< 0,001	1,65	0,107	<0,001	0,017	0,927	0,923
NDF	21	-0,238	0,042	< 0,001	1,34	0,072	<0,001	0,027	0,949	0,946
Tärkkelys	14	0,133	0,048	0,0177	0,86	0,050	<0,001	0,002	0,960	0,957

n= havaintojen lukumäärä, SE=keskivirhe, RMSE=jäännösvaihtelu, R²=mallin selitysaste, AdjR²=korjattu mallin selitysaste, NDF= neutraalidetergentti-kuitu

Taulukko 7. Dieetin iNDF-pitoisuuden ja AIA-sulavuuden (selittävät muuttujat) ja sulavuussuhdeluvun (orgaanisen aineen sulavuus iNDF merkkiaineena/AIA merkkiaineena) (selitettävä muuttuja) välinen lineaarinen ja toisen asteen yhteys sekamallin regressioanalyysissä.

Selittävä muuttuja	N	Leikkauspiste	SE	Lineaarinen			Toisen asteen			RMSE	R ²	AdjR ²
				Kulma-kerroin	SE	P-arvo	Kulma-kerroin	SE	P-arvo			
Dieetin iNDF-pitoisuus	21	1,05	0,032	-0,001	0,0003	0,034				0,013	0,8127	0,8028
iNDF:n osuus NDF:stä	21	1,06	0,034	-0,440	0,1378	0,033				0,013	0,7838	0,7725
OA:n sulavuus AIA:lla	21	0,44	0,136	0,730	0,1924	0,019				0,015	0,7803	0,7687
NDF:n sulavuus AIA:lla	21	0,80	0,068	0,275	0,1166	0,078				0,015	0,7038	0,6882
	21	0,004	0,347	3,090	1,2191	0,024	-2,45	1,0583	0,036	0,014	0,7687	0,7430

OA= Orgaaninen aine, iNDF= sulamaton detergenttikuitu, NDF=neutraalidetergenttikuitu, OA=orgaaninen aine, AIA= sulamaton tuhka,

SE= keskivirhe, RMSE= jäännösvaihtelu, R²= mallin selitysaste, AdjR²= korjattu mallin selitysaste

7. Tulosten tarkastelu

7.1 Rehujen ja ruokintojen merkkiainepitoisuudet

Tutkimuksessa verrattiin iNDF:llä saatuja sulavuustuloksia AIA:lla saatuihin tuloksiin. Tutkimukset ovat osoittaneet, että AIA:ta on oltava tarpeeksi rehussa realististen sulavuustuloksien saamiseksi (Van Keulen ja Young 1977, Jones ja De Silva 1998). AIA:n määrä rehussa pitäisi olla yli 7,5 g/kg ka, jotta mittaukset olisivat luotettavia (Thonney ym. 1985). Tämän tutkimuksen koeruokinnissa alin AIA-pitoisuus oli 8,6 g/kg ka, joten sitä oli riittävästi sulavuuden määrittämiseen. Sulavuuden mittaamiseen AIA:lla liittyy myös ongelmia, sillä esimerkiksi laiduntavien eläinten sulavuuksia tutkittaessa eläimet saattavat syödä myös maaperää, joka sisältää AIA:ta. Säilörehun teossa syntyvä vaihteleva maakontaminaatio aiheuttaa myös ongelmia. Tällöin sulavuudeksi saadaan vääristynyt tulos (Sales ja Janssens 2003).

Tutkimusaineistossa rehujen iNDF-pitoisuudet vaihtelivat paljon. Kokeessa 311 ensimmäisen sadon nurmisäilörehun iNDF:n pitoisuus oli jopa 146 g/kg ka (rehu tehty 13.6.2013). Touko- ja kesäkuun keskilämpötila oli 2013 selvästi korkeampi kuin vuosien 2012 ja 2014, jolloin muut aineiston säilörehut tehtiin. Tämä selittää keskimääräistä suurempaa iNDF-pitoisuutta ensimmäisessä sadossa, koska korkeassa lämpötilassa ligniiniä kertyy enemmän (Van Soest 1994). Lisäksi vuonna 2013 rehun teko myös viivästyi, joka vaikutti iNDF-pitoisuuksiin. Tutkimusaineiston pienin ensimmäisen sadon iNDF-pitoisuus oli kokeessa 309, 74 g/kg ka. Tutkimuksen rehuista ensimmäisen sadon nurmisäilörehuissa myös iNDF:n osuus NDF:stä oli yleisesti ottaen suurempi kuin kotimaisessa rehutaulukoissa (Luke 2019) annetut arvot. Koeruokinnissa iNDF:n osuudessa NDF:stä oli suurta vaihtelua (136–318 g/kg NDF). Säilörehun iNDF-pitoisuus vaikutti iNDF:n osuuteen NDF:stä osuuden ollessa pienin säilörehussa, jossa oli vähiten iNDF:ää. Vastaavasti säilörehussa, jossa oli eniten iNDF:ää, iNDF:n osuus NDF:stä oli myöskin suurin.

Kokeissa syötettyjen nurmisäilörehujen iNDF-pitoisuudet eivät olleet kokonaan linjassa esimerkiksi kotimaisissa rehutaulukoissa (Luke 2019) olevien keskimääräisten pitoisuuksien kanssa. Nurmisäilörehujen iNDF-pitoisuudet vaihtelevat yleensä 17–167 g/kg ka (Nousiainen ym. 2004). Rehutaulukoissa ensimmäisen sadon nurmisäilörehuilla iNDF-arvot ovat aikaisen korjuun rehulle 42 g/kg ka ja myöhäisen sadon 113 g/kg ka. Tutkimusaineistossa mukana olleiden kokeiden toisen sadon nurmisäilörehujen iNDF:n pitoisuudet ja iNDF:n osuus NDF:stä olivat samaa luokkaa kuin rehutaulukoiden arvot. Kuitenkin kahden kokeen 2. sadon rehuissa oli selkeä ero iNDF:ssä (58 ja 100 g/kg ka).

Muut tutkimukset ovat myös osoittaneet, että niittokerta ja niiton aikainen kasvin kehitysaste vaikuttaa rehun iNDF-pitoisuuteen. Lundin ym. (2007) tutkimuksessa ensimmäisen sadon aikaisin tehdyn säilörehun iNDF-pitoisuus oli 49 g/kg ka ja ensimmäisen sadon myöhään tehdyn 137 g/kg ka. Krämerin ym. (2012) tutkimuksessa nurmikasvien ensimmäisen niiton iNDF-pitoisuus oli 100 g/kg ka, toisen 157 g/kg ka ja kolmannen 210 g/kg ka.

Palkokasvit voivat vaikuttaa ruokintojen iNDF-pitoisuuksiin huomattavasti. Kokeessa 315 käytetyn härkäpapusäilörehun iNDF-pitoisuus oli huomattavasti suurempi (201 g/kg ka) kuin nurmisäilörehujen, ja iNDF:n osuus NDF:stä myöskin paljon suurempi. Härkäpapusäilörehun D-arvo (611 g/kg ka) oli myös paljon pienempi kuin nurmisäilörehujen D-arvot. Krämerin ym. (2012) tutkimuksessa palkokasveilla (sinimailanen, puna- ja valkoapila) iNDF-pitoisuus kasvoi mitä myöhäisemmällä kasvuasteella ne korjattiin (238,2; 247 ja 341,3 g/kg ka). Muissa tutkimuksissa kokoviljasäilörehujen iNDF-pitoisuudet ovat olleet 132, 133 ja 184 g/kg ka, maissisäilörehun 64 ja 97 g/kg ka ja rehu- maissin 178 g/kg ka (Ahvenjärvi ym. 2006, Lund ym. 2007, Krizsan ym. 2012).

Tutkimusaineistossa väkirehukomponenttien pitoisuuksissa oli melko suurta vaihtelua. Ne vaihtelivat 3,2–167 g/kg ka. Lundin ym. (2004) tutkimuksessa havaittiin, että ongelmallisemmat rehut aiheuttavat hyvin erilaisia tuloksia iNDF:n määrittämisessä, vaikka menetelmät olisivat samat. Tällaisia rehuja ovat esimerkiksi ohra, jossa on paljon tärkkelystä, ja rypsi, jossa on paljon rasvaa. Tutkimuksessa ohran iNDF-pitoisuus vaihteli

3,3–5,5 g/kg ka ja rypsirouheen 6,4–12,9 g/kg ka. Pussien huokoskoko ja inkubaatio-aika vaikuttavat määrittelyn tuloksiin, mutta virheitä voi tulla myös pussien pesun aikana sekä pussijäännöksen analysoinnissa. Tämän tutkimuksen kaikissa osakokeissa käytettiin samaa menetelmää ja samaa pussien huokoskoko.

Lundin ym. (2007) mukaan iNDF on hyödyllinen merkkiaine kokonaissulavuuden arvioimisessa, sillä sonnasta voidaan saada edustava näyte toisin kuin ohutsuolesta. Kuitenkaan iNDF ei heidän mukaansa ole hyvä merkkiaine rehuissa, joissa on matala iNDF-pitoisuus, kuten aikaisin korjatussa säilörehussa.

7.2. iNDF- ja AIA-sulavuuksien vertailu

AIA:ta on käytetty monissa kotimaisissa lypsylehmien ruokintatutkimuksissa sulavuuden merkkiaineena. Sen vuoksi sitä käytettiin kontrollina iNDF-merkkiaineelle myös tässä tutkimuksessa, jonka osakokeissa ei tehty sulavuuden määrittystä kokonaiskeruumenetelmällä. Kokonaiskeruuta pidetään kuitenkin standardimenetelmänä ja AIA:n on todettu antavan siihen verrannollisia tuloksia nurmisäilörehuun perustuvilla ruokinoilla (Huhtanen ym. 1994). AIA:ta pidetään hyvänä merkkiaineena, sillä se on myös helpompi mitata kuin muut rehun merkkiaineet (Van Keulen ja Young 1977). Sulavuuden tutkiminen AIA:n avulla on myös halpaa verrattuna kokonaiskeruuseen, mutta vaatii tarkkuutta (Sales ja Janssens 2003). Se myös poistaa kokonaiskeruun tarpeen, joka voi tuoda epätarkkuuksia mittaukseen.

Hyvän merkkiaineen täytyy olla täysin sulamaton ja imeytymätön eli rehussa syödyn määrän tulisi erittyä sonnassa. Aikaisemmissa tutkimuksissa AIA:n recovery-arvo on ollut 89–121 % riippuen siitä, otettiinko mittauksissa huomioon rehutähteiden sisältämä AIA ja minkä vahvuista suolahappoa (HCl) analyyseissä käytettiin (Block ym. 1981, Taniguchi ym. 1985).

Tässä tutkimuksessa ruokintojen iNDF:n recovery-arvo oli keskimäärin 0,922, mutta se vaihteli 0,832–1,068 välillä. Muissa merkkiainetutkimuksissa iNDF:n recovery on ollut lähellä yhtä, joten se osoittaisi sen olevan hyvä merkkiaine (Huhtanen ym. 1994; Ahvenjärvi ym. 2002; Ahvenjärvi ym. 2018). Erot recovery-arvoissa voivat selittyä joko partikkelihäviöllä pussista uittovaiheessa tai pienemmällä mikrobiaktiivisuudella pussien sisällä. Kokeissa myös huomattiin partikkelihäviön olevan erilainen rehunäytteissä ja sontanäytteissä (Huhtanen ym. 1994).

Huhtanen ym. (2006) totesivat, että säilörehunäytteen ligniiniä häviää iNDF:n määrittämisessä. Toisaalta säilörehun orgaanisen aineen sulavuuden ennustaminen iNDF:n avulla parani vain vähän, kun iNDF korjattiin ADL:n hävikin perusteella (Krizsan ym. 2014).

Aineiston koeruokintojen AIA:lla ja iNDF:llä määritetyt orgaanisen aineen sulavuudet poikkesivat keskimäärin toisistaan keskihajonnan ollessa melkein kaksinkertainen iNDF:llä määritettynä verrattuna AIA:lla määritettyyn. AIA:lla saatiin keskimääräisesti aina suuremmat sulavuusarvot kuin iNDF:llä tärkkelyksen sulavuutta lukuun ottamatta. Orgaanisen aineen sulavuuden keskiarvojen ero oli 0,028 ja minimiarvojen ero 0,074. Maksimiarvoissa eroa ei juurikaan ollut (0,002). Orgaanisen aineen sulavuuksien suhdelu eli iNDF-sulavuus/AIA-sulavuus oli keskimäärin 0,959. Hajontaa kuitenkin oli (0,0369), joten vaihtelu oli melko suurta.

Myös muissa AIA:n ja iNDF:n vertailuissa on saatu samansuuntaisia tuloksia kuin tässä tutkimuksessa. Luonnonvarakeskuksen kahden lypsylehmätutkimuksen aineistosta tehdyssä opinnäytetyössä verrattiin AIA:lla ja iNDF:llä määritettyjä sulavuuksia (Guillaume 2014). Myös näissä molemmissa kokeissa iNDF-menetelmä antoi huonommat orgaanisen aineen sulavuudet verrattuna AIA-sulavuuteen ja korrelaatio AIA-menetelmän kanssa oli pieni.

Kun säilörehua korvattiin 25 tai 50 % kuiva-aineesta säilörehun kiintojakeella (nestefraktion puristuksen jälkeinen pulppa) orgaanisen aineen sulavuus ei muuttunut, kun

sulavuus määritettiin AIA:lla (Luke, julkaisematon aineisto). Sen sijaan iNDF:llä määritetty sulavuus heikkeni lineaarisesti pulpan osuuden lisääntyessä. Pulpan iNDF-pitoisuus oli suurempi (91,1 ja 100,8 g/kg ka) kuin alkuperäisen säilörehun (86,9 g/kg ka). Tutkimuksessa ruokintojen orgaanisen aineen iNDF/AIA-sulavuuksien suhdeluvun keskiarvo oli 0,953, eli lähes sama kuin tässä tutkimuksessa (0,959).

Selvitettäessä iNDF:llä ja AIA:lla määritettyjen sulavuuksien yhteyttä regressioanalyysillä kulmakerroin oli suuri ja leikkauspiste negatiivinen kaikkien muiden ravintoaineiden kohdalla paitsi tärkkelyksen. Tämä vahvisti sen, että iNDF:n antama tulos suhteessa AIA-tulokseen ei ole aina sama vaan se vaihtelee riippuen dieetin sulavuudesta. Etsittäessä iNDF- ja AIA-sulavuuksien suhdeluvun ja dieetin ominaisuuksia kuvaavien parametrien yhteyttä huomattiin, että mitä suurempi sulavuus rehuannoksella on, sitä paremmin iNDF vastasi AIA:lla saatuja sulavuustuloksia. Tutkituista dieetin ominaisuuksista dieetin iNDF-pitoisuus selitti parhaiten suhdelukua, sillä mitä pienempi iNDF-pitoisuus rehuannoksessa oli, sitä paremmin AIA-sulavuus ja iNDF-sulavuus vastasivat toisiinsa.

Havaintojen määrän vähäisyyden vuoksi aineistossa ei ollut riittävästi hajontaa väkirehun osuudessa, ruokinnan valkuaispitoisuudessa tai eri säilörehuissa korjuukerran tai koostumuksen suhteen, jotta olisi voinut tarkemmin selvittää niiden vaikutusta eri merkkiaineiden antamiin sulavuuksiin. Näiden tekijöiden vaikutusta on tutkittu yksittäisissä kokeissa, joissa on verrattu merkkiaineita ja kokonaiskeruuta. Kokonaiskeruulla ja iNDF:llä laskettuja sulavuuksia verratessa muun muassa Ahvenjärven ym. (2018) tutkimus osoitti, että iNDF:llä laskettuna kahden dieetin sulavuudessa oli ero dieettien väkirehun osuuden ollessa erilainen. Sen sijaan kokonaiskeruulla sulavuudessa ei ollut eroa dieettien välillä. Seosrehun sisältäessä väkirehua 40 % ka:sta iNDF:n recovery oli 1,05 ja kuiva-aineen sulavuus parempi kuin kokonaiskeruulla määritettynä (0,699 vs 0,689). Väkirehuosuuden ollessa 60 % iNDF-recovery oli 0,95 ja iNDF-sulavuus heikompi kuin kokonaiskeruulla (0,676 vs 0,693).

Maissisäilörehuun pohjautuvassa seosrehuruokinnalla tehdyssä tutkimuksessa (Lee ja Hristov 2013) todettiin merkitseviä dieetin ja merkkiaineen yhdysvaikutuksia. Verrattuna kokonaiskeruuseen AIA yliarvioi etenkin kuidun sulavuutta valkuaisköyhällä ruokinnalla, mutta myös riippumatta valkuaispitoisuudesta. iNDF puolestaan aliarvioi valkuaisköyhän ruokinnan sulavuutta ja yliarvioi runsaasti valkuaista sisältävän ruokinnan sulavuutta kokonaiskeruuseen verrattuna. Merkkiaineiden vertailua tehtiin myös Tammingan ym.(1989 a, b) tutkimuksessa, jossa todettiin, että iNDF ei ole hyvä merkkiaine silloin, kun lypsylehmillä oli väkirehuvaltainen ruokinta. Tutkimuksessa uittomenetelmät kuitenkin poikkesivat nykyisestä, sillä pussien silmäkoko oli 41µm, uitto aika oli 30 päivää ja uitto tehtiin yhdellä lehmällä.

8. Johtopäätökset

Tutkimuksen tavoitteena oli verrata lypsylehmillä iNDF:n ja AIA:n avulla laskettuja sulavuuksia käyttäen aineistona aiemmin tehtyjä sulavuustutkimuksia. Tutkimuksessa selvitettiin, voisiko iNDF:n avulla tutkia ruokintojen sulavuutta luotettavasti verrattuna AIA:lla saatuihin sulavuuksiin. iNDF:llä saatiin keskimääräisesti pienemmät sulavuusarvot kuin AIA:lla tärkkelyksen sulavuutta lukuun ottamatta. Aineiston koeruokintojen orgaanisen aineen sulavuudet poikkesivat toisistaan ja keskihajonta oli melkein kaksinkertainen iNDF:llä määritettynä verrattuna AIA:lla määritettyyn. Tässä tutkimuksessa myös iNDF:n recovery-arvo vaihteli eikä iNDF:n antama tulos suhteessa AIA-tulokseen ollut aina sama vaan se vaihteli riippuen dieetin sulavuudesta. Tutkimuksessa huomattiin, että mitä suurempi sulavuus rehuannoksella oli, sitä paremmin iNDF vastasi AIA:lla saatuja sulavuustuloksia. Mitä pienempi iNDF-pitoisuus rehuannoksessa oli, sitä paremmin AIA-sulavuus ja iNDF-sulavuus vastasivat toisiaan.

Tämän tutkimuksen perusteella iNDF ei arvioi lypsylehmän rehuannosten sulavuuseroja aina samalla kuin AIA. Tutkimuksessa havaintojen määrä oli melko pieni. Aineistossa ei ollut riittävästi hajontaa väkirehun osuudessa, ruokinnan valkuaispitoisuudessa

tai säilörehuissa korjuukerran tai koostumuksen suhteen, jotta olisi voinut tarkemmin selvittää niiden vaikutukset eri merkkiaineiden antamiin sulavuuksiin.

Kiitokset

Haluan kiittää yliopistonlehtori Seija Jaakkolaa erinomaisesta ohjauksesta tämän tutkielman kirjoittamisessa. Sain apua ja kannustusta aina kun sitä tarvitsin. Kiitos myös Tuomo Kokkoselle, joka auttoi ja ohjasi tilastollisten analyysien teossa.

Kiitos ystäväilleni ja perheelleni kannustuksesta ja tuesta opiskelun aikana, sekä hetkistä opiskelun ulkopuolella, jotka auttoivat jaksamaan opinnoissa.

Lähteet

Ahvenjärvi, S., Nyholm, L., Nousiainen, J., Mäntysaari, E. A. & Lidauer, M. 2018. Polyethylene glycol as an indigestible marker to estimate fecal output in dairy cow. *Journal of Dairy Science* 101: 4245–4258.

Ahvenjärvi, S., Joki-Tokola, E., Vanhatalo, A., Jaakkola, S. & Huhtanen, P. 2006. Effects of replacing grass silage with barley silage in dairy cow diets. *Journal of Dairy Science* 89: 1678–1687.

Ahvenjärvi, S. 2002. Determination of ruminal feed digestibility and microbial synthesis based on digesta sampling from the omasal canal. Academic dissertation. Department of Animal Science. University of Helsinki. Publications 63, s. 30. Saatavilla: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/kotie/vk/ahvenjarvi/determin.pdf>.

- Block, E., Kilmer L. H. & Muller, L. D. 1981. Acid insoluble ash as a marker of digestibility for sheep fed corn plants or hay and for lactating dairy cattle fed hay. *Journal of Animal Science* 52:1164-9.
- Chandler, J. A., Jewell, W. J., Gossett, J. M., Van Soest, P. J., & Robertson J. B. 1980. Predicting methane fermentation biodegradability. *Biotechnology and bioengineering symposium* 10: 93–107.
- Clancy M., Wancsness P. J. & Baumgardt, M. 1977. Effect of silage extract on voluntary intake, rumen fluid constituents, and rumen motility. *Journal of Dairy Science* 60: 580-590.
- Colucci, P. E., Macleod, G. K., Grovum, W. L., Mcmillan, I. & Bakkey, D. J. 1990. Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. *Journal of Dairy Science* 73: 2143-2156.
- Cotanch, K. W., Grant, R. J., Van Amburgh, M. E., Zontini, A., Fustini, M., Palmonari, A. & Formigoni, A. 2014. Applications of uNDF in ration modeling and formulation. New York, USA: Miner Agricultural Research Institute 10-38.
- Ellis, W. C., Poppi, D. P., Matis, J. H., Lippke, H., Hill, T. M. & Rouquette, F. M. 1999. Dietary-digestive-metabolic interactions determining the nutritive potential of ruminant diets. In: HJG Jung, GC Fahey Jr., (Eds.), *Nutritional Ecology of Herbivores* (pp. 423-481). American Society of Animal Science.
- Fahey, G. C. Jr. & Jung, H. G. 1983. Lignin as a marker in digestion studies: a review. *Journal of Animal Science* 57: 220-225.
- Gill, M. Rook A.J. & Thiago L.R.S. 1988. Factors affecting the voluntary intake of roughages by the dairy cow. Teoksessa: Garnsworthy P.C (toim.) *Nutrition and Lactation in the Dairy Cow*. Butterworths, London. s. 262-279,
- Glindemann, T., Tas, B. M., Wang, C. Alvers, S. & Susenbeth, A. 2009. Evaluation of titanium dioxide as an inert marker for estimating fecal excretion in grazing sheep. *Animal Feed Science and Technology* 152: 186-197.

- Huhtanen P., Nousiainen J. & Rinne M. 2006b: Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. *Agricultural and Food Science* 15: 293–323.
- Huhtanen, P., Kaustell, K. & Jaakkola, S. 1994. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Animal Feed Science and Technology* 48: 211-227.
- Huhtanen, P. & Jaakkola, S. 1993. The effects of forage preservation method and proportion of concentrate on digestion of cell wall carbohydrates and rumen digesta pool size in cattle. *Grass and Forage Science* 48: 155-165.
- Huhtanen, P. & Khalili, H. 1991. Sucrose supplements in cattle given grass silage-based diet. 3. Rumen pool size and digestion kinetics. *Animal Feed Science and Technology* 33: 275-287.
- Huhtanen, P. 1991. Associative effects of feeds in ruminants. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences. Supplement No. 5*: 37-57.
- Jaakkola, S., Huhtanen, P. & Hissa K. 1991. The effect of cell wall degrading enzymes or formic acid on fermentation quality and digestion of grass silage by cattle. *Grass and Forage Science* 46: 75-87.
- Jones, P. L. & De Silva, S. S. 1998. Comparison of internal and external markers in digestibility studies involving the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark (Decapoda, Parastacidae). *Aquaculture Research* 29: 487-493.
- Judkins, M. B., Krysl, L. J. & Barton, R. K. 1990. Estimating diet digestibility: a comparison of 11 techniques across six different diets fed to rams. *Journal of Animal Science* 68: 1405-1415
- Kotb A. R. & Luckey T. D. 1972. Markers in nutrition. *Nutrition abstracts and reviews* 42: 813-845.
- Krizsan, S. J., Nyholm, L., Nousiainen, J., Südekum, K.-H. & Huhtanen, P. 2012. Comparison of in vitro and in situ methods in evaluation of forage digestibility in ruminants. *Journal of Animal Science* 90: 3162-3173.

- Krämer, M., Weisbjerg, M. R., Lund, P., Jensen, C. S. & Pedersen, M. G. 2012. Estimation of indigestible NDF in forages and concentrates from cell wall composition. *Animal Feed Science and Technology* 177, Issues 1–2, s. 40-51.
- Lamminen, M. E, Kokkonen, T. J, Halmemies-Beauchet-Filleau, A. I. K, Termonen, T. J., Korhonen, P., Vanhatalo, A. O. & Jaakkola, S. L. 2016. Härkäpapusäilörehun ja rypsitason vaikutukset maitotuotokseen ja ravintoaineiden hyväksikäyttöön. Julkaisussa N. Schulman & J. Helin (toim), *Maataloustieteen päivät 2016 (verkkojulkaisu)*. Suomen Maataloustieteellisen Seuran julkaisuja, Nro 33, Vuosikerta. 2016, Suomen maataloustieteellinen seura, Maataloustieteen päivät, 12/01/2016.
- Lamminen, M. E., Halmemies-Beauchet-Filleau, A. I. K., Kokkonen, T. J., Simpura, I. A., Jaakkola, S. L., & Vanhatalo, A. O. 2017. Comparison of microalgae and rapeseed meal as supplementary protein in the grass silage based nutrition of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 234: 295-311.
- Lamminen, M. E., Halmemies-Beauchet-Filleau, A. I. K., Kokkonen, T. J., Jaakkola, S. L. & Vanhatalo, A. O. 2019a. Different microalgae species as a substitutive protein feed for soya bean meal in grass silage based dairy cow diets. *Animal Feed Science and Technology*, 47: 112-126.
- Lamminen, M. E., Halmemies-Beauchet-Filleau, A. I. K., Kokkonen, T. J., Vanhatalo, A. O. Jaakkola, S. L. 2019b. The effect of partial substitution of rapeseed meal and faba beans by *Spirulina platensis* microalgae on milk production, nitrogen utilization and amino acid metabolism of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, submitted.
- Lippke, H., Jacobs, B. F. & Ellis, W.C. 1986. Recovery of indigestible fiber from feces of sheep and cattle on forage diets. *Journal of Dairy Science* 69: 403-412.
- Lippke, H. 2002. Estimation of forage intake by ruminants on pasture. *Crop Science* 42: 869-872.
- Luke 2019. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset. Luonnonvarakeskus. Viitattu 3.3.2019. Saatavissa: <http://www.luke.fi/rehutaulukot>.

- Lund, P., Weisbjerg, M. R., Ahvenjärvi, S., Huhtanen, P., Udén, P., Olafsson, B. & Volden, H. 2004. Nordic ringtest on INDF content and NDF degradation characteristics in three feeds. *Journal of Animal and Feed Sciences* 13: 139–142.
- Lund, M., Weisbjerg, R., Hvelplund, T. & Knudsen, K. E. B. 2007. Determination of digestibility of different forages in dairy cows using indigestible NDF as marker. *Acta Agriculturae Scand Section A*, 57: 16-29.
- McDonald, P., Edwards, R. A. & Greenhalgh, J. F. D. 2011. *Animal Nutrition*. 7. painos. Longman, London and New York. 543 p.
- McNab J. M. 2000. Rapid metabolizable energy assays. Teoksessa: J.P.F. Mello. *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CABI International, Wallingford, Oxon (UK), 307-315.
- Merchen, N. R. 1988. Digestion, absorption and excretion in ruminants. Teoksessa: *The Ruminant animal: Digestive physiology and nutrition*. D.C. Church, ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. s. 172-201.
- Myers, W. D., Ludden, P. A., Nayigihugu, V. & Hess, B. W. 2004. Technical note: a procedure for preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of Animal Science* 82: 179-193.
- NRC (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7. painos. National Research Council, Washington, USA, 381 p.
- Park, S., Gordon, F. J., Angnew, R. S., Barnes, R. J. & Steen, R. W. J. 1997. The use of near infrared reflectance spectroscopy on dried samples to predict biological parameters of grass silage. *Animal Feed Science Technology* 68: 235–246.
- Penning, P. D. & Johnson, R. H. 1983. The use of internal markers to estimate herbage intake and digestibility. 1. Potentially indigestible cellulose and acid insoluble ash. *Journal of Agricultural Science* 100: 127- 131.
- Puhakka, L., Jaakkola, S., Simpura, I., Kokkonen, T., & Vanhatalo, A. 2016. Effects of replacing rapeseed meal with fava bean at 2 concentrate crude protein levels on feed intake, nutrient digestion, and milk production in cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 99: 7993-8006.

Sales, J. & Janssens, G. P. J. 2003. Acid-insoluble ash as a marker in digestibility studies: a review. *Journal of Animal Feed Sciences* 12:383–401.

Sipilä, A. & Rinne, M. 2006. Nurmirehun sulavuus. Nurmitieto 4.2.1. Suomen Nurmihdistyksen ja MTT:n julkaisusarja. Julkaisupäivä: 31.5.2006. Saatavissa: www.agro-net.fi/nurmiyhdistys.

Soufizadeh, M., Pirmohammadi, R., Alijoo, Y., Behroozyar, H. K. 2018. Indigestible neutral detergent fibers: Relationship between forage fragility and neutral detergent fibers digestibility in total mixed ration and some feedstuffs in dairy cattle. *Veterinary Research Forum* 9 (1) 49–57.

Stensig, T. & Robinson, P. H. 1997. Digestion and passage kinetics of forage fibre in dairy cows as affected by fibre-free concentrate in the diet. *Journal of Dairy Science* 80: 1339- 1352.

St-Pierre, N. R. 2001. Invited review: Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. *Journal of Dairy Science* 84: 741-755.

Taniguchi, K., Yamatani, Y. & Otan, I. 1986. Acid-insoluble Ash as an indicator for determining the feed consumption and the digestibility in the lactating dairy cow. *Japanese Society of Zootechnical Science* 57: 438-441.

Tamminga, S., Robinson, P.H., Meijs, S. & Boer, H. 1989a. Feed components as internal markers in digestion studies with dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 27: 49-57.

Tamminga, S., Robinson, P.H., Vogt, M. & Boer, H. 1989b. Rumen ingesta kinetics of cell wall components in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 25: 89-98.

Thomas C. & Thomas P.C. 1985. Factors affecting the nutritive value of grass silages. Teoksessa: Haresign W. ja Cole D.J. A (toim.) *Recent Advances in Animal Nutrition* 1985. Butterworths, London. s. 223-256.

Thonney, M. L., Palhof, B. A., DeCarlo, M. R., Ross, D. A., Firth, N. L., Quaas, R. L., Perosio, D. J., Duhaime, D. J., Rolins, S. R. & Nour A. Y. M. 1985. Sources of variation of dry matter digestibility measured by the acid insoluble ash marker. *Journal of Dairy Science* 68: 661-668.

Van Keulen, J. & Young, B. A. 1977. Evaluation of acid insoluble ash as a natural marker for digestibility studies. *Journal of Animal Science* 44: 282-287.

Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Toinen painos. Cornell University Press, Ithaca, NY.

Vandenberg G. W. & De La Noüe J. 2001. Apparent digestibility comparison in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) assessed using three methods of faeces collection and three digestibility markers. *Aquaculture Nutrition* 7: 237-245.

Welch, J. G. 1990. Inert plastics as indicators of physiological processes in the gastrointestinal tract of ruminants. *Journal of Animal Science* 68: 2930-2935.